semble que l'étude des formules chromosomiques puisse apporter un complément utile. Les premières analyses et comparaisons de caryotypes, doublées d'essais d'hybridations, montrent que la spéciation de ce genre est en cours. Il faudra certes encore de nombreuses recherches avant que la position précise de toutes les espèces ou sous-espèces décrites d'Europe occidentale soit établie. Dans cette attente, il convient d'observer la plus grande prudence dans la classification des *Pitymys*.

Résumé

Complétant les premières données de Matthey (1953, 1954, 1955, 1964), l'auteur a étudié les formules chromosomiques de 67 campagnols du genre *Pitymys* appartenant à 5 espèces. Les nombres diploïdes (2N) et les nombres fondamentaux (NF) des individus analysés sont: *P. duodecimcostatus* 62/?, *P. mariae* 62/72 (fig. 1), *P. multiplex* 48/54 (fig. 2), *P. savii* 54/62 (fig. 3), *P. subterraneus* 52, 53, 54/60 (fig. 4, 6 et 5). Cette dernière espèce présente un polymorphisme chromosomique de type robertsonien. La parenté des caryotypes de ces différentes espèces est évoquée.

Une carte (fig. 7) indique l'origine des *Pitymys* étudiés. L'analyse chromosomique des sujets du col du Saint-Gotthard, Suisse, montre que, contrairement aux conclusions de Dottrens (1961), *P. incertus* (de Sélys-Longchamps, 1841) ne doit pas être considéré comme un synonyme de *P. multiplex* (Fatio, 1905), mais comme celui de *P. subterraneus* (de Sélys-Longchamps, 1836).

Une étude plus complète des chromosomes des *Pitymys* européens est en cours.

Zusammenfassung

Um die ersten Daten von Matthey (1953, 1954, 1955, 1964) zu ergänzen, untersuchte der Verfasser die Chromosomensätze von 5 Arten der Gattung *Pitymys*, an insgesamt 67 Tieren. Die diploïden Zahlen (2N) und die Grundzahlen (NF) der untersuchten Individuen sind: *P. duodecimcostatus* 62/?, *P. mariae* 62/72 (Fig. 1), *P. multiplex* 48/54 (Fig. 2), *P. savii* 54/62 (Fig. 3), *P. subterraneus* 52, 53, 54/60 (Fig. 4, 6 und 5). Die letztgenannte Art zeigt ein Robertsonisches Chromosomenpolymorphismus. Das Verwandtschaftverhältnis der Karyotypen dieser verschiedenen Species wird besprochen.

Die Herkunft der untersuchten *Pitymys* wird kartographisch angegeben (Fig. 7). Die Analyse der vom St.-Gotthard-Pass, Schweiz, stammenden Individuen zeigt, dass, entgegen den Schlussfolgerungen von Dottrens (1961), *P. incertus* (de Sélys-Longchamps, 1841) nicht als Synonym mit *P. multiplex* (Fatio, 1905), sondern mit *P. subterraneus* (de Sélys-Longchamps, 1836) anzusehen ist.

Ein vollständigeres Studium der Chromosomen der europäischen *Pitymys*-Arten ist im Gange.

Summary

Completing the first data of MATTHEY (1953, 1954, 1955, 1964), the author has been studying the chromosomes complements of 67 voles of the genus *Pitymys* belonging to 5 species. The diploid numbers (2N) and the fundamental numbers (NF) of the analysed *Pitymys* are: *P. duodecimcostatus* 62/?, *P. mariae* 62/72 (fig. 1), *P. multiplex* 48/54 (fig. 2), *P. savii* 54/62 (fig. 3), *P. subterraneus* 52, 53, 54/60 (fig. 4, 6 and 5). This last species shows a Robertsonian chromosomal polymorphism. The relationship between the karyotypes of these different species is suggested.

A map (fig. 7) indicates the origin of the studied *Pitymys*. The chromosomal analysis of the specimens from the St.-Gotthard pass, Switzerland, shows that, in opposition to the conclusions of DOTTRENS (1961), *P. incertus* (de Sélys-Longchamps, 1841) must not be regarded as a synonym of *P. multiplex* (Fatio, 1905), but as the one of *P. subterraneus* (de Sélys-Longchamps, 1836).

A more complete study on the chromosomes of European *Pitymys* is in progress.

BIBLIOGRAPHIE

DOTTRENS, E. 1961. *Arvicola incertus de Sélys-Longchamps était un Pitymys.* Arch. Sciences, Genève 14: 353-364.

ELLERMAN, J. R. and T. C. S. MORRISON-SCOTT. 1951. *Checklist of Palaearctic and Indian Mammals 1758 to 1946.* British Museum, London.

HEIM DE BALSAC, H. et F. DE BEAUFORT. 1967. *La spéciation des Pitymys gallo-ibériques. Une nouvelle espèce pour la faune de France.* Mammalia 31: 367-380.

KRATOCHVIL, J. 1964. *Die systematische Stellung von Pitymys tatricus Kratochvil, 1952.* Z. Säugetierk. 29: 230-235.

VON LEHMANN, E. 1965. *Eine zoologische Exkursion ins Bergell.* Jahresbericht der Naturforschenden Gesellschaft Graubündens 91: 1-10.

MALEC, F. und G. STORCH. 1968. *Insektenfresser und Nagetiere aus dem Trentino, Italien (Mammalia: Insectivora und Rodentia).* Senckenbergiana biol. 49: 89-98.

MATTHEY, R. 1953. *Les chromosomes des Muridae. Révision critique et matériaux nouveaux pour servir à l'histoire de l'évolution chromosomique chez ces rongeurs.* Rev. suisse Zool. 60: 225-283.

— 1954. *Nouvelles recherches sur les chromosomes des Muridae.* Caryologia 6: 1-44.

— 1955. *Nouveaux documents sur les chromosomes des Muridae. Problèmes de cytologie comparée et de taxonomie chez les Microtinae.* Rev. suisse Zool. 62: 163-206.

— 1964. *La formule chromosomique et la position systématique de Pitymys tatricus Kratochvil (Rodentia-Microtinae).* Z. Säugetierk. 29: 235-242.

MEYLAN, A. 1967. *Formules chromosomiques et polymorphisme robertsonien chez Blarina brevicauda (Say) (Mammalia: Insectivora).* Can. J. Genet. Cytol. 45: 1119-1127.

MILLER, G. S. 1912. *Catalogue of the Mammals of Western Europe (Europe exclusive of Russia)*. British Museum, London.

SPITZ, F. et M.-C. SAINT-GIRONS. 1969. *Etude de la répartition en France de quelques Soricidae et Microtinae par l'analyse des pelotes de réjection de Tyto alba.* Terre et Vie 116: 246- 268.

TOSCHI, A. 1965. *Fauna d'Italia. Vol. VII. Mammalia.* Edizioni Calderini, Bologna.

N° 35. **H. Nydegger** und **H. Stadler.** — Effekte von Phenylthiocarbamid (PTC) auf die Entwicklung von Mäusen.

(Mit 3 Abbildungen und 4 Tabellen).

Zoologisches Institut der Universität Bern, Abt. f. Entwicklungsphysiologie. Leitung Prof. P. A. TSCHUMI.

1. EINLEITUNG

Die Fähigkeit, den bitteren Geschmack einer Lösung von Phenylthiocarbamid (PTC) wahrzunehmen, wird häufig als Test in der Humangenetik angewendet (z.B. STERN, 1968).

Da Versuchspersonen, unter anderem auch gravide Frauen, manchmal unabsichtlich von dieser Lösung trinken, stellt sich die Frage, ob PTC teratogen wirkt, insbesondere auf fötale Extremitäten, welche auf teratogene Stoffe besonders empfindlich sind. Da PTC dem Thioharnstoff chemisch verwandt ist (H_2N-CS-NH_2, H_2N-CS-NH-C_6H_5), liegt es auch nahe zu untersuchen, ob PTC ähnlich wie Thioharnstoff, der als Thyreostatikum bekannt ist (Uebersicht bei GEER et al., 1964), wirkt.

Neugeborene Säugetiere sind auf Thyroxinmangel sehr empfindlich, insbesondere das Gehirn (MYANT, 1966, LEVINE, 1966). Neure Untersuchungen haben gezeigt, dass bei neugeborenen Säugern die Proteinsynthese im Gehirn durch Thyroxin stark stimuliert wird (BALAZS, 1968, FORD, 1968) und andererseits Thyroxinmangel die Proteinsynthese in diesem Organ hemmt (NIEVEL et al., 1968, GEEL et al., 1967, BALAZS et al., 1968, TALANTI et al., 1968). Dieses empfindliche Organ ist daher zur Untersuchung thyreostatischer Effekte besonders geeignet.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung des thyreostatischen Effektes von PTC wurde die Schilddrüse histologisch untersucht.

2. Material und Methoden

Als Versuchstiere dienten 5 Pärchen 2 Monate alter Mäuse (Stamm JCR albino, Tierzucht-Institut der Universität Zürich).

2.1 Vorversuche zur Bestimmung der verabreichten PTC-Menge:

Während 11 Tagen wurden je 5 weibliche und männliche Mäuse getrennt in 2 Käfigen gehalten und mit Brunnenwasser versorgt. Als Futter erhielten sie das normale Standardfutter ad libitum. 2 Paare wurden mit Brunnenwasser versorgt und dienten als Kontrolle. Je ein weiteres Paar erhielt PTC in Konzentrationen von 4 mg, 0.4 mg und 0.2 mg PTC pro Liter Brunnenwasser. Diese Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf Wurfgrösse, Gewicht und Aussehen der neugeborenen Mäuse. Es wurde schliesslich für den Hauptversuch eine PTC-Konzentration gewählt, welche der in der Humangenetik häufig verwendeten Testlösung von 40 mg/l entsprach. Die Trinkmengen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Im Vergleich zu Brunnenwasser zeigte sich, dass die tägliche Trinkmenge von PTC-haltigem Wasser (40 mg/l) etwa 30% geringer war: Wasser: pro Tier und pro Tag durchschnittlich 9.5 ml, Wasser + PTC: pro Tier und pro Tag durchschnittlich 6.1 ml. Pro Tag ergibt das etwa 6 mg PTC pro kg Körpergewicht, die aufgenommen werden. Bei noch höheren PTC-Konzentrationen (1 g/l) wurde noch viel weniger getrunken (Tab. 1). Trotzdem ergibt das eine tägliche PTC-Aufnahme von etwa 25 mg pro kg Körpergewicht.

Während der ganzen Gravidität wurden die Mäuse mit 40 mg PTC/l versorgt. Die Lösung wurde alle 2 Tage frisch angesetzt.

2.2 An Neugeborenen ausgeführte Untersuchungen

Die eintägigen Mäuse wurden nach dem Schema, wie es in Abbildung 1 dargestellt ist, weiterverarbeitet.

2.3 Knorpelfärbung:

Ein Teil der Jungtiere wurde zur Darstellung des Knorpels nach der Methode von Zbären (1969) behandelt. Um klare Präparate zu erhalten, wurde den Tieren die Haut abgezogen und die Eingeweide entfernt. Die Behandlung der Objekte ging nach folgendem Zeitplan:

30 Min. in 1n-HCl.

1—24 h färben mit Astrablau (0.1 g Astrablau FM (Chroma 10110) in 100 ml A. dest. unter Umrühren lösen und 10 ml 25%ige HCl zugeben) 30 Min. in 1n-HCl.

1 h in fliessendem Wasser auswaschen.

A: Einzeltiere(nach Geschlecht getrennt):

5 Weibchen, pro Tier:	5.8	5 Männchen, pro Tier:	9.1
	4.5		8.5
(mittleres Gewicht:28g)	6.6	(mittleres Gewicht:45g)	9.o
	4.6		8.2
Mittelwert:	5.4	Mittelwert:	8.o
	6.2		8.2
5.5 ± o.45	5.6	8.5 ± o.43	8.6

B: Pärchen:

1.Pärchen, pro Tier:	8.1	Wurfgrösse: 9 Junge
	5.o	
Mittelwert:	6.4	Durchschnittsgewicht:
	6.o	
6.4 ± 1.12	6.2	1.8g
	6.5	
2.Pärchen, pro Tier:	7.o	Wurfgrösse: 7 Junge
	7.5	
Mittelwert:	7.7	Durchschnittsgewicht:
	6.5	
8.2 ± o.95	7.5	1.7g
	12.o	
	9.1	
3.Pärchen, pro Tier:	4.3	Wurfgrösse: 7 Junge
	7.5	
Mittelwert:	8.5	Durchschnittsgewicht:
	8.5	
7.2 ± 1.24	7.1	1.8g
	5.9	
	8.5	

C: Trinkmenge von PTC-haltigem Wasser(4omg/1)

1.Pärchen, Mittelwert pro Tier: 5.9 ± o.7
Wurf: 8 Junge, Durchschnittsgewicht: 1.6g

2.Pärchen, Mittelwert pro Tier: 6.o ± 1.3
Wurf: 5 Junge, Durchschnittsgewicht: 1.8g

3.Pärchen, Mittelwert pro Tier: 6.2 ± o.9
Wurf: 5 Junge, Durchschnittsgewicht: 1.9g

4.Pärchen, Mittelwert pro Tier: 6.2 ± 1.4
Wurf: 7 Junge, Durchschnittsgewicht: 1.8g

D:				
Trinkmenge von Wasser mit 1gPTC/1:	o.8	1.3	o.7	1.o
Kontrollen(Wasser):	12.5	14.5	7.3	9.1

TAB. 1.

Trinkmengen (in ml/24 h) von Wasser (A und B) und PTC-haltigem Wasser (C und D) bei adulten Mäusen und Wurfgrösse.

3—12 h differenzieren in einem Gemisch von 60 ml Isopropylalkohol (70%) +40 ml Benzylalkohol.

24 h entwässern mit (60 ml Methylglykol + 40 ml Wintergrünöl).

2 mal 24 h aufhellen in Wintergrünöl und Aufbewahren in Wintergrünöl.

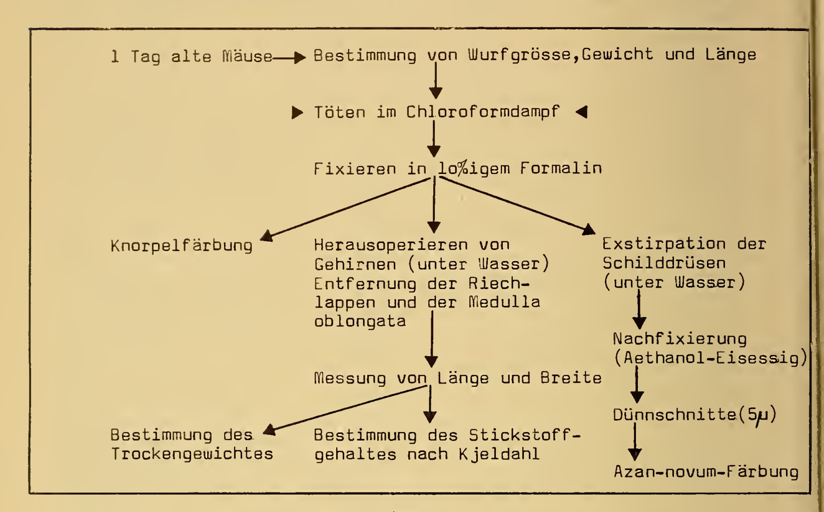


Abb. 1.

Untersuchungsschema der PTC-behandelten und unbehandelten Mäuse.

2.4 Grösse, Trockengewicht und Stickstoffgehalt des Gehirns

An eintägigen Mäusen wurde das Gehirn sorgfältig herauspräpariert und dicht hinter dem Cerebellum von der medulla oblongata getrennt. Ferner wurden die Riechlappen entfernt. Mit einem Wild-M-11-Stereomikroskop wurde die maximale Breite und Länge gemessen.

Um das Trockengewicht der Gehirne zu eruieren wurden diese bei etwa 130° C während 8 h getrocknet.

Der Gesamtstickstoffgehalt der Gehirne wurde mit der Mikrokjeldahlmethode bestimmt.

Das Prinzip der Kjeldahl-Methode ist folgendes: Organische Substanz wird durch Erhitzen in konzentrierter Schwefelsäure zerstört und der vorhandene Stickstoff in Ammoniak umgewandelt, das sich mit der überschüssigen Schwefelsäure zu Ammoniumsulfat verbindet. Durch Zusatz von Natronlauge wird das Ammoniak freigesetzt und in eine bestimmte Menge Säure destilliert. Diese Säurevorlage wird dann mit 0.01 n HCl zum Umschlagspunkt eines zugegebenen Indikators zurücktitriert. Einem ml ver-

brauchter Säure entspricht 1.4 mg N. Folgende Reagentien wurden verwendet: Acidum sulfuricum fumans mit 5% P_2O_2 (Merck), Katalysator (32 g K_2SO_4 + 5 g $HgSO_4$ + 1 g Selen), 30%ige Natronlauge, 2%ige Borsäure als Säurevorlage, 0.01 n HCl zum Titrieren und Methylrot-Methylenblau-Indikator (0.1%, 1:1). Gewebeproben wurden in Aufschlusskolben verascht (ca. 4h) und anschliessend in Erlenmeyerkolben mit 10 ml 2%iger Borsäure + 0.2 ml Indikator destilliert. Diese Säurevorlage wurde dann mit 0.01 n HCl zum Indikatorumschlagspunkt zurücktitriert. Als Standard wurde NH_4SO_4 (1mg/ml) verwendet.

2.5 *Untersuchung der Schilddrüse*

Schliesslich wurden die Schilddrüsen aus eintägigen, formolfixierten Mäusen exstirpiert, in Alkohol-Eisessig nachfixiert (1 h), in 70% igem Alkohol gewaschen und dehydriert. Die Drüsen wurden in Paraplast (Gurr) eingebettet, in 5 μ dicke Schnitte zerlegt und nach Entparaffinierung mit Azan-novum nach Gerdies gefärbt.

3. Ergebnisse

Die Wurfgrösse sowie die Gesamtlänge und das Gewicht der Neugeborenen von PTC-behandelten und unbehandelten Mäusen zeigten keine signifikanten Unterschiede:

	Kontrollen	PTC-Tiere
Wurf:	7—9 Junge	5—8 Junge
Länge:	29.4—31.4 mm	28.5—31.7 mm
Gewicht:	1.7—1.9 g	1.6—1.9 g

Zur Untersuchung des Schädels, des Rumpfskelettes und der Extremitäten wurden Astrablau-gefärbte Knorpelpräparate verwendet. Es konnten keine Anomalien am Skelett und namentlich an den Extremitäten festgestellt werden. PTC-behandelte Tiere hatten ein normales Skelett (vgl. Abb. 2).

Untersuchungen am Gehirn eintägiger Mäuse, deren Mütter während der ganzen Schwangerschaft PTC (40 mg/l) erhielten:

Die im Stereomikroskop vorgenommenen Messungen ergaben, dass sowohl die Breite (breiteste Stelle des Telencephalons) als auch die Länge (vorderes Ende des Telencephalons bis und mit Cerebellum) bei PTC-Tieren gegenüber den Kontrollen deutlich reduziert waren (Tab. 2).

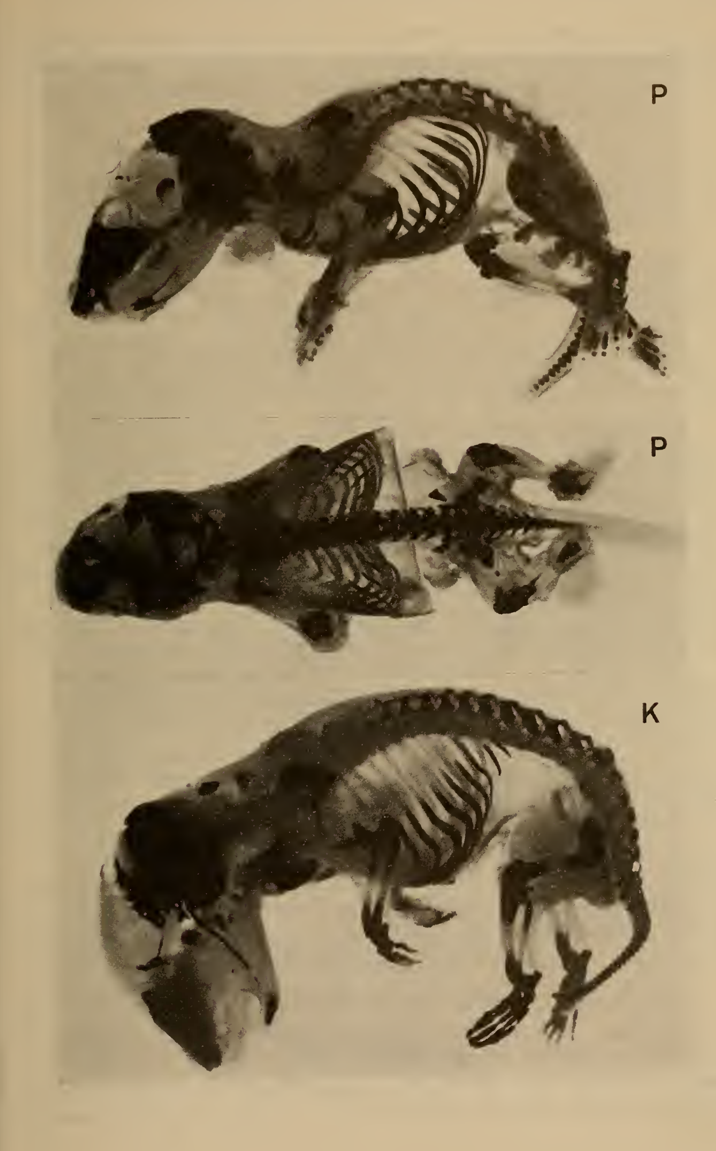
Tabelle 2: Längen- und Breitenmessung an Gehirnen eintägiger Mäuse mit und ohne PTC-Behandlung.

		PTC(4omg/l)	Kontrollen	Differenz
1.Versuch:	mittlere Länge:	8.18 mm	8.8o mm	7.1%
(je 5 Tiere)	mittlere Breite:	6.26 mm	7.21 mm	13.2%
2.Versuch:	mittlere Länge:	6.21 mm	8.38 mm	25.9%
(je loTiere)	mittlere Breite:	5.28 mm	7.46 mm	29.2%



ABB. 2.

Extremitäten und Skelett von eintägigen Mäusen nach Behandlung der Muttertiere mit PTC (40 mg/1). K = Kontrollen P = PTC-Behandlung


P
P
K

Die Bestimmung des *Trockengewichts* der Gehirne zeigte, dass der Grössenunterschied von Gehirnen PTC-behandelter und unbehandelter Mäuse nicht auf verschiedenem Wassergehalt beruht, sondern durch die unterschiedliche Gewebemasse verursacht wird. (Tab. 3).

Tabelle 3. Trockengewicht von Gehirnen eintägiger Mäuse mit und ohne PTC-Behandlung. (Angaben in mg ± S.D.) (Durchschnittswerte)

	PTC(4omg/l)	Kontrollen	Differenz	Signifikanz
1. Versuch: (je 5 Tiere)	6.8 ± 1.o	9.4 ± 1.9	27.8%	$p < 0.05$
2. Versuch: (je lo Tiere)	8.6 ± 1.6	14.o ± 2.9	38.7%	$p < 0.001$

Es lag nahe anzunehmen, dass der Substanzverlust im Gehirn nach PTC-Behandlung sich an den Proteinen manifestieren könnte, weil einerseits diese Stoffklasse neben den Lipiden den Hauptanteil der organischen Hirnsubstanz ausmacht und andererseits die Proteinsynthese besonders anfällig gegen äussere chemische Einflüsse ist. Die Messung des *Gesamtstickstoffs* mit der Mikrokjeldahlmethode ergab bei PTC-behandelten Mäusen eine signifikante Erniedrigung gegenüber den Kontrolltieren (Tab. 4). Da der grösste Teil des Stickstoffs in Proteinen vorkommt, lässt sich aus dieser Untersuchung schliessen, dass eine PTC-Behandlung eine Verminderung des Proteingehaltes im Gehirn bewirkt.

Tabelle 4. Gesamtstickstoffgehalt von Gehirnen eintägiger Mäuse mit und ohne PTC-Behandlung.

	PTC(4omg/l)		Kontrollen	
1. Versuch: lo%iges Homogenat	78.oμg N	62.5%	139μg N	1oo%
(je 5 Tiere) 5%iges Homogenat	56.5μg N	72.5%	87μg N	1oo%
2. Versuch:				
(je lo Tiere(pro Gehirn:				
(Mittelwert aus 5 Gehirnen)	644 μg N	73.o%	882 μg N	1oo%
(Mittelwert aus 5 Gehirnen)	653 μg N	71.6%	912 μg N	1oo%

Untersuchungen an Schilddrüsen: Die Ergebnisse am Gehirn legten es nahe, Untersuchungen auch auf die Schilddrüse auszudehnen, da Störungen im Wachstum des Gehirns bei neugeborenen Säugern eng mit der Schilddrüsenfunktion gekoppelt sein können. Nach Azan-Färbung von Dünnschnitten der Schilddrüse zeigte sich bei PTC-behandelten Mäusen eine Blaufärbung des

Schilddrüsenkolloids, während bei Kontrolltieren dieses Kolloid nicht angefärbt wurde (Abb. 3). Die Grösse der Follikel und die Höhe des Follikelepithels waren bei PTC-behandelten Tieren und Kontrollen gleich.

4. Diskussion

Wie aus den Ergebnissen über die Trinkmenge hervorgeht, scheinen adulte Tiere „Schmecker" für Phenylthiocarbamid zu sein, da sie mit steigender PTC-Konzentration weniger trinken.

Obschon während der ganzen Dauer der Gravidität den Muttertieren PTC verabreicht wurde und somit auch die hochempfindlichen Phasen der Extremitätenbildung unter PTC-Einfluss standen, bewirkte PTC keine Missbildungen des Skeletts und im besonderen der Extremitäten an den Föten.

Der Effekt von PTC auf das Gehirn ist vermutlich derselbe wie bei Schilddrüsenstörungen oder nach Verabreichung von Thyreostatika. Die empfindlichste Phase der Gehirndifferenzierung erstreckt sich bei Säugern von einigen Tagen vor der Geburt bis einige Wochen nach der Geburt. Der PTC-Effekt müsste also während dieser Zeit erstmals manifest werden. Tatsächlich ist bei neugeborenen Ratten der ^{14}C-Leucin-Einbau in das Gehirn bei Hypothyreose gegenüber Kontrollen erniedrigt (Geel, Valcana, Timiras, 1967). Dieses Ergebnis zeigt also einerseits die Empfindlichkeit des Gehirns von Neugeborenen und andererseits die Erniedrigung der Proteinsynthese unter hypothyreotischen Bedingungen. Die enge Verwandtschaft von PTC mit dem in der Wirkung lange bekannten Thioharnstoff legt die Annahme nahe, dass PTC via Blockierung der Schilddrüsenfunktion die Proteinsynthese im Gehirn hemmt.

Phenylthiocarbamid wurde als Thyreostatikum noch nicht beschrieben (vgl. Geer et al., 1964). Die Untersuchung des Schilddrüsenkolloids zeigte bezüglich der Färbbarkeit einen Unterschied zwischen Behandelten und Kontrollen. Könnte dies bedeuten, dass nach PTC-Behandlung, also wenn das Kolloid färbbar wird, Thyroxin nicht mehr aus den Follikeln freigesetzt werden kann? Es ist bekannt, dass Thyroxin im Kolloid der Schilddrüse gespeichert wird.

Bei den Kontrolltieren, deren Kolloid nicht färbbar ist, liesse sich dann postulieren, dass praktisch alles Thyroxin an der Peripherie ist und daher keine Speicherung im Kolloid erfolgt. Bei PTC-behandelten Jungtieren dagegen wäre die Situation umgekehrt: ein bedeutender Anteil des Thyroxins läge als Speicherform im Kolloid vor, währen die Peripherie, und damit auch das Gehirn, sich in einem Zustand des Thyroxinmangels befände.

Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob Phenylthiocarbamid (PTC) auf Mäuse teratogene Effekte habe. Die Muttertiere erhielten während der ganzen Schwangerschaft

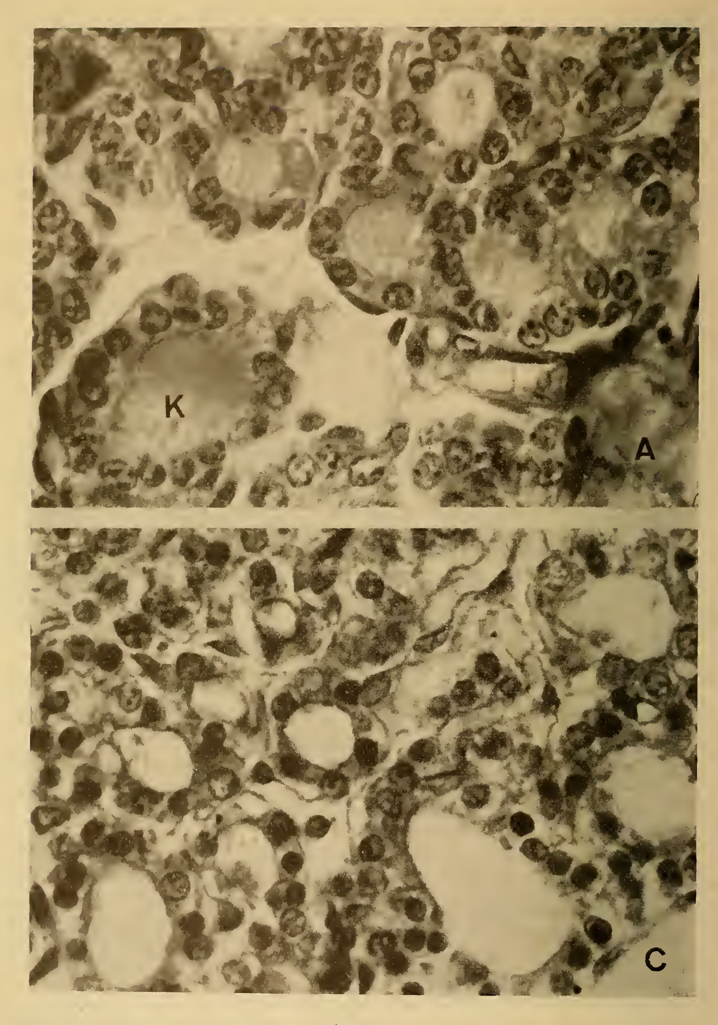
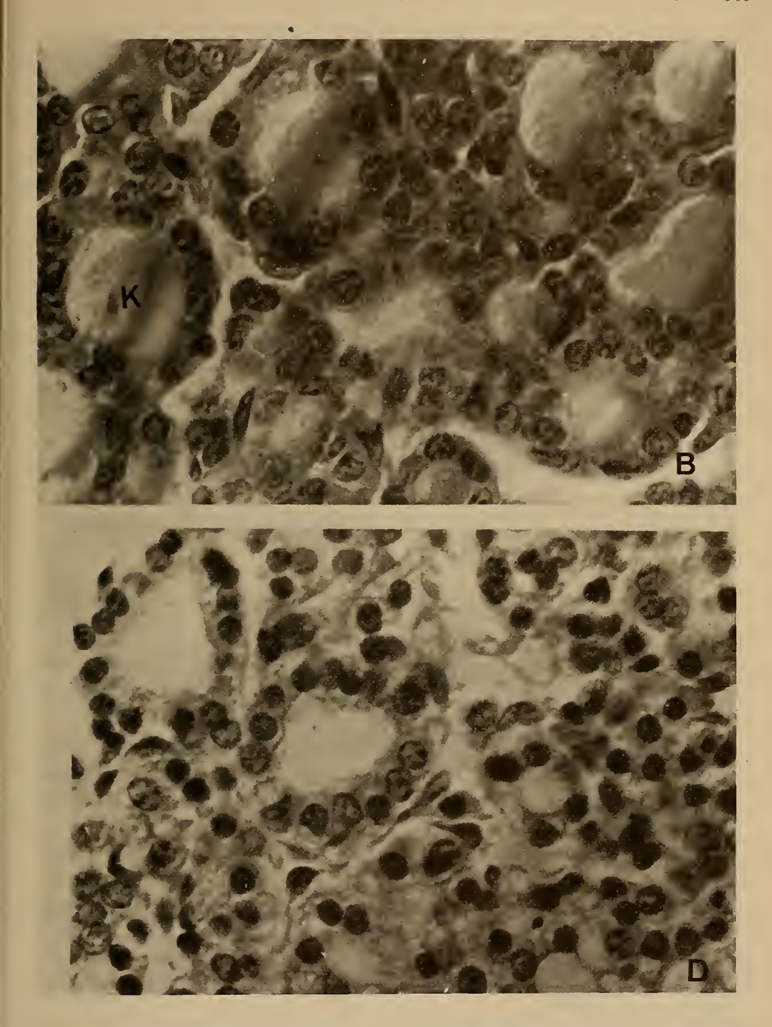


ABB. 3.

Azan-Färbung von Schilddrüsenfollikeln neugeborener Mäuse nach PTC-Behandlung (A und B), bzw. ohne Behandlung (C und D). K = Kolloid (1 cm entspricht 10 μ).


K
B
D